



Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque

Characterization of native strains of *Azotobacter* spp. and its effect on growth of *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomato” in Lambayeque

Cynthia Escobar¹, Yuri Horna¹, Carmen Carreño^{1,*}, Gilmar Mendoza²

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.

²Departamento de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Trujillo.

Recibido 30 enero 2011; aceptado 12 febrero 2011

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar y determinar el efecto de cepas nativas de *Azotobacter* spp. en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, como una alternativa al uso indiscriminado de fertilizantes químicos. Se tomaron muestras de raíces y suelo rizosférico de hortalizas con las que se realizaron diluciones (10^{-4}) en caldo Ashby-Sacarosa y se incubaron a 30 °C hasta observar un color amarillo, turbidez y película superficial. El género *Azotobacter* se identificó en agar mineral sin nitrógeno y Ashby-Benzoato, obteniéndose 96 cepas con una producción de 7.10 a 57.99 mgL⁻¹ de ácido indolacético, 0.13 a 1.64 mgL⁻¹ de nitrógeno fijado como amonio y hasta 1.61 % de eficiencia en la solubilización de roca fosfórica de Bayóvar. Se obtuvo una suspensión celular (10^8) de cada una de las cuatro cepas con los mayores valores y se inocularon independientemente y en consorcio, así como una combinación con 50 % de urea-100 % de roca fosfórica, en la rizósfera de tomate cv. Río Grande, en un diseño experimental completamente aleatorio. Todas las cepas nativas incrementaron la altura, volumen radicular, materia seca total, parte aérea y radicular frente al testigo absoluto.

Palabras clave: *Azotobacter*, PGPRs, *Lycopersicon esculentum* Mill., ácido indolacético.

Abstract

The objective of this research was characterize and determine the effect of native strains of *Azotobacter* spp. on the vegetative growth of *Lycopersicon esculentum* Mill. "Tomato" as an alternative to the indiscriminate use of chemical fertilizers. Samples were taken from roots and rhizosphere soil of vegetables from which dilutions (10^{-4}) in Ashby-sucrose broth and incubated at 30 °C to observe a yellow color, turbidity and surface film. The genus *Azotobacter* was identified in mineral agar without nitrogen and Ashby-benzoate, obtaining 96 strains with a yield of 7.10 to 57.99 mgL⁻¹ indoleacetic acid, 0.13 to 1.64 mgL⁻¹ of fixed nitrogen as ammonium and up to 1.61% efficiency in the solubilization of phosphate Bayovar rock. It obtained a cell suspension (10^8) of each of the four strains with the highest values and inoculated independently and in consortium, as well as a combination with 50% urea-100 % phosphate rock in the rhizosphere of Río Grande tomato, in a completely randomized design. The entire native strains increased height, root volume, total dry matter, shoot and root, compared with absolute control.

Keywords: *Azotobacter*, PGPRs, *Lycopersicon esculentum* Mill., indoleacetic acid.

* Autor para correspondencia

E-mail: carreno@email.com (C. Carreño)

1. Introducción

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las principales hortalizas cultivadas en el mundo y una de las de mayor valor económico. En el Perú, la producción asciende a 221594 t por año y en la región Lambayeque se estima en 5000 t (Ministerio de Agricultura, 2010). El aumento de la productividad es importante para la rentabilidad del cultivo; sin embargo, ésta se ve afectada por diversos factores limitantes como la baja fertilidad del suelo, siendo necesario la aplicación de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), para asegurar el rendimiento adecuado (Loredo *et al.*, 2004).

El nitrógeno, presente en los tejidos verdes de las plantas y en semillas, es considerado un macronutriente junto con el fósforo y el potasio. Los suelos tienen cantidades de nitrógeno muy superiores a las requeridas por los cultivos; sin embargo, casi todo este elemento se encuentra en la materia orgánica y anualmente sólo se mineralizan 1 a 3 % del nitrógeno total (Ardila, 2007). Debido a esta liberación lenta, el nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento de los cultivos por lo cual es indispensable el uso de productos sintéticos para lograr una producción agrícola aceptable. El fósforo, de vital importancia para el desarrollo de los vegetales, se encuentra en el suelo como formas solubles en muy baja concentración, con valores comprendidos entre 5 y 30 mg kg⁻¹, debido a que el fósforo soluble reacciona con calcio, hierro o aluminio que provocan su precipitación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo, por lo que mayoritariamente no son aprovechados por los cultivos (Fernández *et al.*, 2005).

Los fertilizantes químicos han sido benéficos para el sector agrícola; no obstante, el abuso en su utilización genera residuos que producen salinización, problemas en el drenaje, compactación del suelo y

disminución de la actividad microbiana comprometida en la nutrición vegetal. Cada año se incrementa la cantidad de fertilizantes aplicados debido a la menor eficiencia de adsorción en el suelo y absorción por la planta, aumentando los costos de producción. Asimismo, se genera un problema ambiental debido a la producción de gases tóxicos que se desprenden de los fertilizantes como los óxidos de nitrógeno que dañan la capa de ozono (Lara *et al.*, 2007).

Como una alternativa a los fertilizantes químicos está la posibilidad de utilizar bacterias del suelo, que como parte de su metabolismo incrementan la fertilidad y benefician a las plantas, por lo que se les ha denominado promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs). Entre sus actividades están la fijación del nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de hormonas, antibióticos y otros compuestos de importancia para el desarrollo de los cultivos. Estas bacterias y otros microorganismos usados en la fertilización de los suelos agrícolas constituyen los biofertilizantes y ya existen algunos que son comercializados; sin embargo, algunas veces no son efectivos debido a que proceden de condiciones edafoclimáticas totalmente diferentes, por lo que se prefiere el uso de microorganismos propios de los suelos donde van a ser utilizados, adaptados a las condiciones ecológicas y que puedan ser utilizados, compitiendo exitosamente con la biota nativa. Por lo expuesto, se realizó el presente estudio, cuyo objetivos fueron aislar y caracterizar cepas nativas de *Azotobacter* spp., así como determinar el efecto de cuatro cepas en el desarrollo del cultivo de tomate en invernadero.

2. Material y métodos

Diseño metodológico

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases. En la primera fase descriptiva, se realizó el aislamiento e identificación de *Azotobacter* spp., así como la cuantificación

del ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y roca fosfórica de Bayóvar solubilizada por las cepas nativas, utilizando un diseño no experimental transeccional descriptivo (Hernández *et al.*, 2003). En la segunda fase, con una investigación explicativa, se determinó el efecto de la inoculación de cuatro cepas nativas productoras de ácido indolacético, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato en el desarrollo vegetativo de tomate cv. Río Grande, en condiciones de invernadero.

Muestreo

Durante los meses de marzo a junio de 2009, se recolectaron 60 muestras de raíces y suelo rizosférico de cultivos de tomate, *Lactuca sativa* L. “lechuga”, *Allium cepa* L. “cebolla”, *Spinacia oleracea* L. “espinaca”, *Daucus carota* L. “zanahoria” y *Beta vulgaris* L. “betarraga”, en campos agrícolas del caserío Callanca (6° 53' 49" y 6° 47' 57" de latitud sur y 79° 51' 46" y 79° 46' 59" de longitud oeste), distrito de Monsefú, y distrito de Reque (6° 52' 47" y 6° 48' 55" de latitud sur y 79° 50' 47" y 79° 44' 59" de longitud oeste), provincia de Chiclayo, región Lambayeque. La zona presenta un clima subtropical, con una temperatura media de 28 °C. Las muestras se transportaron para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Obtención de cepas nativas de *Azotobacter* spp.

Se tomaron 10 g de raíces y suelo adherido a ellas, se depositaron en frascos de vidrio con 90 mL de solución salina (NaCl 0.89 %) estéril y se agitaron manualmente durante 20 minutos para obtener una suspensión de suelo, que a su vez constituyó la dilución 10^{-1} . Para favorecer el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, cada muestra fue enriquecida, para lo cual se realizaron tres diluciones adicionales, una en solución salina

estéril (10^{-2}) y dos (10^{-3} y 10^{-4}) en 9 mL de caldo Ashby-Sacarosa con azul de bromotimol. Las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se incubaron a 28 °C por 4 días y se reportaron como positivos los caldos donde se observó viraje del verde al amarillo, turbidez y una película superficial. Para el aislamiento se tomó una alícuota, se sembró mediante la técnica francesa de agotamiento y estría en agar Ashby-Sacarosa y se incubó a 28 °C hasta por 4 días, seleccionándose las colonias grandes y viscosas a las que se realizó una tinción de Gram y cuando se observaron bacilos grandes, Gram negativos y quistes, se sembraron en agar mineral sin nitrógeno. Después de una incubación a 28 °C por 48 horas, se seleccionaron las colonias, positivas a las pruebas de catalasa y oxidasa y se sembraron en agar Ashby-Benzoato, considerándose presuntivamente como bacterias del género *Azotobacter* aquellas que presentaron crecimiento y producción de pigmentos. A su vez, se sembraron en agar tripticasa soya (TSA), a 28 °C por 48 horas y posteriormente se guardaron a temperatura ambiente. Para la identificación se investigó la utilización de glucosa, maltosa y manitol y se realizó la prueba de desnitrificación, según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity *et al.*, 2004) y Jiménez (2007).

Cuantificación de ácido indolacético, nitrógeno y solubilización de roca fosfórica

Cada una de las cepas de *Azotobacter* spp. cultivadas en TSA por 48 horas, se sembraron por duplicado en 5 mL de caldo Tripticasa Soya y se incubaron por 96 horas a 28 °C en agitación constante (150 rpm). Después, se realizó un análisis colorimétrico para determinar la concentración de ácido indolacético (AIA), para lo cual cada cultivo bacteriano se centrifugó a 1000 rpm por 20 minutos. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 1 mL al que se adicionó 1 mL del reactivo de Salkowski en relación 1:1 v/v, se mantuvo en oscuridad a 30 °C por 30 minutos

y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 530 nm. Por su parte, para cuantificar el nitrógeno fijado, se utilizó el método indirecto de valoración del ión amonio, con la técnica colorimétrica de Berthelot: fenol-hipoclorito. Cada una de las cepas bacterianas se cultivó en 20 mL de medio Burk modificado, a 28 °C, durante 96 horas, a 150 rpm. Después, se tomaron 5 mL de los cultivos y se adicionaron 5 mL de cloruro de potasio 2M, se homogenizaron y se dejaron en reposo por 1 hora. A continuación los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos y al sobrenadante se adicionaron 0.4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0.4 mL de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 1 mL de solución oxidante. La mezcla se mantuvo en reposo por 1 hora y posteriormente se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 632.9 nm. Se seleccionaron las cuatro cepas nativas con los mayores valores en ácido indolacético, así como en nitrógeno fijado como amonio y se determinó la eficiencia de solubilización de roca fosfórica de Bayóvar. Las cepas fueron sembradas en Agar Sundara Rao Sinha, SRSM, con roca fosfórica de Bayóvar (30% P_2O_5), considerándose como positivo para la solubilización el cambio del color del indicador al amarillo y la formación de un halo translúcido alrededor de la colonia después de una incubación a 28 °C por 4 días. A continuación de cada cepa de *Azotobacter* cultivada en TSA se obtuvo una suspensión, se estandarizó la concentración a 3×10^8 células mL^{-1} y se inocularon 25 mL en biorreactores tipo tanque, Batch, con flujo de aire descendente (Miranda *et al.*, 2006), conteniendo 225 mL de caldo SRSM. La incubación se realizó a 28 °C, con aireación constante (0.8 vvm) durante 10 días. Para la cuantificación del fósforo solubilizado, a partir de la inoculación (0 horas) y cada 24 horas hasta los 10 días, se tomaron muestras de 20 mL de los cultivos a las que se les determinó el pH y se cuantificó el fósforo soluble mediante el método colorimétrico del

molibdato (Rodier y Rodi, 1981). Para el cálculo del porcentaje de eficiencia de solubilización de roca fosfórica se restó la concentración de fósforo del caldo SRSM (S_i = 15.26 g de roca fosfórica por litro, equivalentes a 2000 mgL^{-1}) menos la concentración de fósforo no solubilizado remanente. El valor obtenido se dividió entre el S_i y a su vez se multiplicó por 100.

Recolección y análisis físico químico del suelo experimental

En campos agrícolas comerciales del caserío de Callanca, distrito de Monsefú y del distrito de Reque, se recolectaron 40 submuestras de suelo de 2 kg cada una, a una profundidad de 0.20 m. Las submuestras se mezclaron para obtener un total de 80 kg de suelo y se tomó 1 kg para la caracterización física química en el laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Según los resultados, el suelo es fuertemente alcalino (pH 8.24) y medianamente salino (CE 5.14 mmhos cm^{-1}) con una textura franco areno – arcilloso, con un contenido bajo de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y carbonato de calcio, de 0.5 %, 0.09 %, 5.5 ppm y 0.42 % y un contenido medio de potasio de 7.15 ppm. Después el suelo se tamizó con una malla de 0.16 mm, se esterilizó en autoclave a 121 °C y a 1 atmósfera de presión durante 3 horas (Díaz *et al.*, 2001) y se distribuyó en 36 macetas a razón de 2 kg por maceta.

Registro de temperatura

Durante los meses de enero a marzo, la temperatura promedio en invernadero fue de 30 °C con un valor máximo de 31 °C y un mínimo de 29 °C.

Características de la especie vegetal cultivada

Se sembró tomate cv. Río Grande, que requiere 78 días a la madurez fisiológica y 105 a 140 días (128 días) al inicio de cosecha, con 4 a 5 kg de frutos por planta y

con un peso de 150 a 180 g por fruto (Sánchez y Zuloeta, 2002).

Diseño experimental

El trabajo de investigación se realizó utilizando el Diseño Experimental Completamente Aleatorio (DCA), con doce tratamientos y tres repeticiones, totalizando 36 unidades experimentales. Los tratamientos correspondieron a cuatro cepas nativas de *Azotobacter* spp. (TC30, ZC26, TC06 y TC20), cuatro tratamientos donde se combinaron cada cepa con 50 % de fertilizante nitrogenado y 100 % de fosforado, un tratamiento de las cuatro cepas de *Azotobacter* spp. en consorcio, un tratamiento del consorcio con 50 % de fertilizante nitrogenado y 100 % de fosforado, un testigo químico (50% de fertilizante nitrogenado y 100% de fosforado) y un testigo absoluto.

Siembra de semillas de tomate

En cada una de las 36 macetas con suelo tratado, previamente humedecido y distribuidas según el diseño experimental se sembraron cinco semillas de tomate. Después de 20 días se eliminaron las plantas más pequeñas, para finalmente conservar dos por maceta.

Inoculación de *Azotobacter* spp.

Cada cepa nativa de *Azotobacter* spp. se sembró en TSA a 28 °C por 48 horas y con la biomasa desarrollada se obtuvieron suspensiones en solución salina estéril cuya concentración se estandarizó a 3×10^8 células mL⁻¹. Después de 20 días de la siembra se inocularon 10 mL en la rizósfera, retirando cuidadosamente el suelo hasta descubrir las raíces en cuatro puntos equidistantes de la planta.

Fertilización química

La aplicación de nitrógeno como urea (46 % N) y fósforo como roca fosfórica de Bayóvar (30 % P₂O₅) se realizó a 10 cm alrededor de

la base de la planta. Inmediatamente después de la inoculación, se aplicó el 100% de la dosis de P recomendada (100 kg ha⁻¹), equivalente a 0.7442 g de roca fosfórica de Bayóvar por maceta y 10 días después de la inoculación bacteriana se aplicó el 50 % de la dosis de N recomendada (180 kg ha⁻¹), equivalente a 0.4369 g de urea por maceta.

Evaluaciones

Transcurridos 70 días después de la siembra, se extrajeron las plantas, determinándose la altura y el peso de la materia seca aérea y radicular. Asimismo, se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje:

$$IEI (\%) = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$) para comparar la medias entre ellos (Hernández *et al.*, 2003). Se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0.

3. Resultados y discusión

El 93.33% de las muestras de raíces y suelo adherido de hortalizas resultó positivo para el enriquecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, porcentaje superior a 42.5% y 30.0%; reportados por Jiménez (2007) y Borda *et al.* (2009). La diferencia puede ser explicada porque en el presente estudio se trabajó con muestras enriquecidas, lo que permitió el incremento de estas bacterias, a diferencia de la técnica de gránulos de suelo utilizada por otros investigadores, donde no se enriqueció la muestra. Así mismo, el 81.67 % de las muestras resultó positivo para el aislamiento de *Azotobacter* spp., obteniéndose 96 cepas, donde microscópicamente se observaron bacilos grandes, Gram negativos y quistes (Figura 1), coincidiendo con Lozada y Rivas (2010), respecto a que las especies del género

Azotobacter establecen asociación con una gran cantidad de cultivos como hortalizas, maíz, arroz, yuca y batata entre otros.

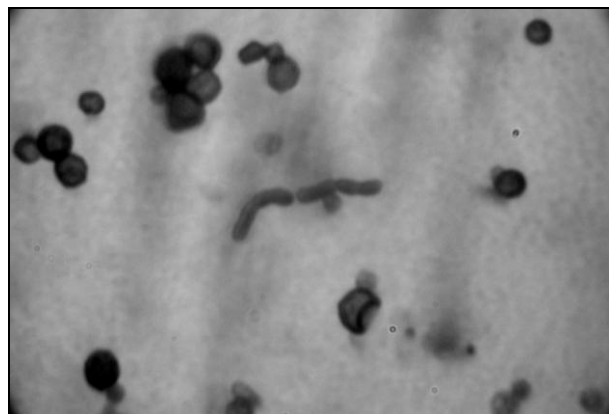


Figura 1. Observación microscópica de bacilos y quistes característicos de *Azotobacter* spp.

Las cepas nativas de *Azotobacter* spp. sintetizaron entre 7.10 a 57.99 mgL⁻¹ de AIA, valores que se encuentran dentro del rango de 3 a 65 mgL⁻¹ de AIA para diferentes especies de *Azotobacter* (Anwar, 2000). Así mismo, fijaron nitrógeno, alcanzando entre 0.13 a 1.64 mgL⁻¹ de amonio. El valor máximo es superior a 0.26 mgL⁻¹ reportado por Lara *et al.* (2007) en el medio Burk modificado. Fueron

seleccionadas cuatro cepas con los mayores valores (Tabla 1), que a su vez, desarrollaron en agar SRSM con viraje del indicador al amarillo, como producto de la presencia de ácidos orgánicos producidos por estas bacterias (Mantilla, 2007; Jiménez, 2007); sin embargo, no se observaron los típicos halos de solubilización de fósforo.

Tabla 1

Ácido indolacético (mgL⁻¹) producido y nitrógeno fijado (mgL⁻¹ de amonio) por cuatro cepas nativas de *Azotobacter* spp.

Cepa <i>Azotobacter</i> spp.	Ácido indolacético (mgL ⁻¹)	Amonio (mgL ⁻¹)
TC06	11.99	1.64
TC20	10.44	0.91
TC30	57.99	0.26
ZC26	14.21	0.56

De igual manera, Borda *et al.* (2009) cultivaron *Azotobacter* spp. en medio Picowskaya modificado demostrando la acidificación del medio, pero no los halos de solubilización.

Tabla 2

Fósforo solubilizado (mgL⁻¹) y eficiencia (%) de solubilización de roca fosfórica de Bayóvar por cuatro cepas nativas de *Azotobacter* spp. cultivadas en caldo SRSM.

Cepa <i>Azotobacter</i> sp.	Fósforo solubilizado (mgL ⁻¹)	S _f (mg/L)	Tiempo de incubación (días)	Eficiencia (%)
TC30	2.46	1 967.89	6	1.61
ZC26	0.77	1 969.57	9	1.52
TC06	0.57	1 969.77	9	1.51
TC20	0.46	1 969.89	8	1.51

Al respecto, Quiral (2006), indicó que la técnica de agar fosfato precipitado es útil para aislar microorganismos solubilizadores, pero tiene sensibilidad limitada porque la tasa de difusión de los ácidos orgánicos excretados y el crecimiento de la colonia afectan el tamaño del halo, así como la solubilidad de la fuente de fósforo, que en la presente investigación fue roca fosfórica y que es tres veces menos soluble que el fosfato bicálcico utilizado frecuentemente en el medio SRSM (Aparicio y Arias, 2010).

El valor máximo en la eficiencia de solubilización de roca fosfórica (Tabla 2), fue de 1.6 %, por lo que las cepas nativas de *Azotobacter* spp. no pueden ser consideradas como eficientes solubilizadoras, coincidiendo con Borda *et al.* (2008), quienes concluyeron que el potencial de estas bacterias como promotoras del crecimiento de las plantas se debe a su capacidad para fijar nitrógeno y producir ácido indolacético, a pesar que no son eficientes solubilizadoras de fósforo.

Todas las cepas nativas de *Azotobacter* spp. influenciaron positivamente el desarrollo vegetativo de tomate cv. Río Grande en

invernadero, observándose disminución en el número de días a la floración, incremento en la altura, volumen radicular y peso de la biomasa seca total, parte aérea y radicular (Tabla 3), alcanzándose índices de efectividad de hasta 28.41, 27.58, 104.58, 101.20 y 191.74% respectivamente frente al testigo absoluto (Tabla 4, figura 2), coincidiendo con García *et al.* (2001); Bonilla *et al.* (2002); Reyes *et al.* (2008) y Dibut (2009), quienes demostraron que bacterias del género *Azotobacter* favorecen el desarrollo vegetativo de diferentes cultivos, por lo que se les considera como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs).

Así mismo, Borda *et al.* (2009) y Lozada y Rivas (2010) concluyeron que *Azotobacter* es un fijador de nitrógeno de vida libre que promueve el crecimiento de raíces, lo que conlleva a un aumento en la concentración de materia seca.

Por su parte, Dibut (2009) mencionó que entre los efectos benéficos de *Azotobacter* en las plantas se consideran el incremento de altura, área radicular y rendimiento a la cosecha.

Tabla 3

Días al inicio de la floración, altura, volumen radicular y peso de la biomasa seca total, parte aérea y radicular de *Lycopersicon esculentum* Mill. por efecto de cuatro cepas de *Azotobacter* spp, testigos químico y absoluto.

Características	Azotobacter spp.					Testigo químico	Testigo absoluto
	ZC26	TC20	TC06	TC30	Consorcio		
Floración (días)	57.67	58.00	52.67	52.33	52.00	58.67	59.33
Altura (cm)	52.77	51.67	53.63	48.00	53.83	47.10	41.77
Raíces (cm ³)	11.17	12.33	10.33	10.50	13.83	9.83	9.67
Biomasa total (g)	11.26	11.05	8.83	7.63	13.59	7.53	5.51
Biomasa aérea (g)	8.25	6.95	6.61	5.39	8.25	5.80	4.10
Biomasa raíces (g)	30.01	4.10	2.22	2.24	5.34	1.63	1.41

Tabla 4

Índices de efectividad (%) en características de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” inoculado con cepas nativas de *Azotobacter* spp.

Características	<i>Azotobacter</i> spp.					Testigo químico
	ZC26	TC20	TC06	TC30	Consorcio	
Altura	26.34	23.70	28.41	14.92	28.89	12.77
Volumen radicular	15.52	27.58	6.90	8.62	43.10	1.72
Biomasa seca total	104.58	100.73	60.33	38.58	146.77	34.87
Biomasa seca parte aérea	101.20	69.50	61.09	31.50	101.07	41.42
Biomasa seca radicular	114.31	191.74	57.94	59.22	280.00	15.66



Figura 2. Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, 40 días después de la inoculación individual y en consorcio de cepas nativas de *Azotobacter* spp.

Las cepas nativas *Azotobacter* spp. ZC26 y TC20 alcanzaron los mayores valores en los índices de efectividad en volumen radicular y peso de la biomasa seca total, aérea y radicular, superiores a los de *Azotobacter* spp. TC30, seleccionada por su valor máximo en ácido indolacético (57.99 mgL^{-1}). Investigadores como Celis y Gallardo (2008) demostraron que las auxinas, principalmente el AIA, regulan la promoción del crecimiento y diferenciación celular, por lo que inducen crecimiento en longitud de la planta, mayor volumen radicular, mayor floración y maduración de frutos; sin embargo, los efectos

de las auxinas son dependientes de la concentración, que generalmente debe ser mínima para estimular el crecimiento, porque concentraciones superiores ocasionan efectos inhibitorios (Mantilla, 2007). No obstante, el efecto positivo del AIA se hizo evidente en las plantas de tomate inoculadas con *Azotobacter* spp. TC30 y TC06, que iniciaron la floración con mayor precocidad, coincidiendo con Bonilla *et al.* (2002), quienes determinaron un menor número de días a la floración en plantas de tomate inoculadas con *Azotobacter* frente al testigo.

La aplicación de 50 % de urea y 100 % de roca fosfórica de Bayóvar con cada una de las cepas nativas de *Azotobacter* spp. (Tabla 5), incrementó mayoritariamente el peso total y parte aérea de las plantas y en menor grado el volumen y peso de la parte radicular frente a los tratamientos donde no se aplicaron los fertilizantes químicos, coincidiendo con Medina (2000) citado por Lozada y Rivas (2010), quienes evaluaron el efecto de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *Azotobacter chroococcum* solos y en combinación con NPK, en el cultivo de tomate cv. Campbell-28 en etapa de semillero, determinando que en altura y biomasa fresca, los tratamientos inoculados con las bacterias superaron al tratamiento sin fertilizar, y éstos a su vez fueron superados por el tratamiento

Azotobacter chroococcum + NPK. Lozada y Rivas (2010) explicaron que el suministro de nutrientes, particularmente nitrógeno, junto a la inoculación de *Azotobacter* spp. permiten las mejores respuestas en los cultivos, debido a que las bacterias fijadoras de nitrógeno para su establecimiento en el suelo requieren condiciones como temperatura, pH, humedad y fuentes nutricionales de carbono, nitrógeno y fósforo.

La inoculación del consorcio de cepas nativas de *Azotobacter* spp. disminuyó el número de días a la floración y permitió alcanzar valores en volumen y biomasa radicular así como en altura y biomasa seca total y de la parte aérea que no fueron estadísticamente diferentes de

los obtenidos con los tratamientos donde se aplicó el consorcio con 50% de urea más 100% de roca fosfórica, así como cada una de las cepas de *Azotobacter* spp. más los fertilizantes químicos.

La mayor efectividad del consorcio es explicada por las interacciones como proto-cooperación y simbiosis que existen en los microorganismos y que pueden ser beneficiosas al mejorar el desarrollo y crecimiento o permitir la supervivencia (Coyne, 2000). Por esta razón, diversos microorganismos como las bacterias lácticas, generalmente se utilizan en mezcla de cepas de una misma especie o de géneros diferentes.

Tabla 5

Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) del volumen radicular (cm^3), peso (g) de biomasa seca total, parte aérea y radicular de *Lycopersicon esculentum* Mill. por efecto de cuatro cepas nativas de *Azotobacter* spp. y sus combinaciones en Lambayeque.

Características	Volumen radicular (cm^3)	Peso de biomasa seca (g)		
		Total	Parte aérea	Parte radicular
<i>Azotobacter</i> spp en consorcio	13.83 a	13.59 a	8.25 abc	5.34 a
<i>Azotobacter</i> spp. en consorcio + Urea + RF	13.50 a	14.09 a	9.14 a	4.95 a
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG TC20 + Urea + RF	13.17 a	13.06 ab	8.70 ab	4.37 a
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG ZC26 + Urea + RF	12.50 ab	13.05 ab	8.25 ab	4.21 ab
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG TC06 + Urea + RF	12.33 abc	11.82 bc	7.65 bcd	4.16 ab
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG TC30 + Urea + RF	12.33 abc	11.20 c	7.15 cd	4.04 ab
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG TC20	12.33 abc	11.05 c	6.95 de	4.10 ab
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG ZC26	11.17 bcd	11.26 c	8.25 abc	3.01 bc
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG TC30	10.50 cd	7.63 de	5.39 f	2.24 cd
<i>Azotobacter</i> sp. UNPRG TC06	10.33 d	8.83 d	6.61 def	2.22 cd
Testigo químico	9.83 d	7.43 e	5.80 ef	1.63 d
Testigo absoluto	9.67 d	5.51 f	4.10 g	1.41 d

La protooperación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en la elaboración del yogurt es el ejemplo más conocido y probablemente la asociación más estable, donde los lactobacilos suministran los aminoácidos y péptidos que los estreptococos necesitan y a su vez éstos producen ácido fórmico que estimula el desarrollo de los bacilos lácticos (Heller, 2008). De manera similar, aunque en un proceso diferente, Castro y Gonzáles (2003) demostraron una mayor eficiencia en la degradación de cianuro por consorcios de bacterias, frente al valor alcanzado con la inoculación de cada una de los microorganismos independientemente. Por lo expuesto, la aplicación en consorcio de las cepas nativas de *Azotobacter* sp. TC20, ZC26, TC06 y TC30 productoras de ácido indolacético, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo, es una alternativa para la aplicación de fertilizantes químicos en el cultivo de tomate.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que las cuatro cepas nativas de *Azotobacter* spp., productoras de ácido indolacético, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de roca fosfórica influenciaron positivamente en el desarrollo vegetativo de tomate cv. Río Grande, disminuyendo el número de días a la floración e incrementando la altura, volumen radicular, materia seca total, aérea y radicular de plantas de tomate cv. Río Grande.

Así mismo, cuando estas cepas se inocularon en consorcio, los índices de efectividad fueron superiores a los obtenidos con la inoculación individual, sus combinaciones con 50 % de urea y 100 % de roca y testigo químico, alcanzando valores de 28.89 %, 43,10 %, 146.77 %, 101.07 % y 280.00 %, respectivamente frente al testigo absoluto.

Referencias

- Anwar, G. 2000. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis. University of Punjab. India.
- Aparicio, J.; Arias, L. 2010. Efecto de hongos solubilizadores de roca fosfórica de Bayóvar en el desarrollo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. Tesis Lic. Biología. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Ardila, L. 2007. Fijación de Nitrógeno atmosférico. Agricultura Sensitiva. Disponible en: http://www.agriculturasensitiva.com/n_atmosferico.htm.
- Bonilla, R.; Novo, R.; Venegas, N.; Galvis, A.; Martínez, M.; Parra, D. 2002. Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. Editorial Corpoica, Colombia.
- Borda, D.; Pardo, J.; Martínez, M.; Montaña, J. 2009. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. Revista Universitas Scientiarum 14.
- Castro, M.; Gonzáles, F. 2003. Eficiencia de la biodegradación de cianuro por un consorcio microbiano aislado de aguas superficiales de quebradas que alimentan el río Llaucana. Cajamarca, Febrero-Diciembre, 2002. Tesis Lic. Biología. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Celis, L.; Gallardo, I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo, España.
- Díaz, P.; Dávila, J.; Espinosa, M.; Cardenas, H. 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. Terra 19: 327-335.
- Dibut, B., 2009. Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. La Habana, Cuba. Editorial Universitaria. Disponible en: <http://revistas.mes.edu.cu>.
- Fernández, L.; Rojas, F.; Vásquez, E.; Medina, A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencia del Suelo 23: 215-220.
- García, I.; Medina, M.; Espinosa, J. 2001. Desarrollo de un yogurt con cualidades prebióticas. Revista Chilena de Nutrición 36: 308.
- Garrity, M.; Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J.; Boone, D.; De Vos, P. 2004. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gamma proteobacteria. 2 ed. Editorial Springer, Estados Unidos.
- Heller, K. 2008. Bacterias probióticas en alimentos fermentados. Características de los productos y microorganismos iniciadores. Mundo Lácteo y Cárnico. Disponible en <http://www.mundolacteoycarnico.com>.
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 2003. Metodología de la Investigación. 3 ed. Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A., México.

- Jiménez, D. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Tesis Microbiólogo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Lara, C.; Villalba, M.; Oviedo, L. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la Zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 9 (2): 6-14.
- Loredo, C.; López, L.; Espinosa, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. Terra Latinoamericana, 22 (2): 225-239.
- Lozada, L.; Rivas, C. 2010. Evaluación del efecto de la inoculación de *Azotobacter* spp. en plantas de ají dulce (*Capsicum frutescens*). Trabajo de grado Técnico Superior Agrícola. Universidad de los Andes, Trujillo.
- Mantilla, M. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. Tesis Microbiólogo Agrícola. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Ministerio de Agricultura 2010. Estadística Agraria Mensual. Octubre 2010. Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos del Ministerio de Agricultura. Perú.
- Miranda, H.; Robles, H.; Villanueva, L.; Rodriguez, C. 2006. Biorreactores, Diseños y Aplicaciones. Sociedad Peruana de Biotecnología. Trujillo, Perú.
- Quitral, A., 2005. Solubilización de roca fosfórica por hongos rizosféricos aislados de especies forrajeras de importancia en la X Región de Chile. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Rojas, J.; N. Moreno. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Revista Colombiana de Biotecnología 10 (2): 27-35.
- Reyes, I.; Alvarez, L.; Ayoubi, H.; Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro 20 (01): 37-48.
- Rodier, J.; Rodi, L. 1981. Análisis de Aguas. Ediciones Omega, España.
- Sánchez, A.; Zuloeta, J. 2002. Fuentes y dosis de abonamiento en el manejo agroecológico de cultivos asociados de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Río Grande y beterraga (*Beta vulgaris* L.) cv. Early Gonder, en la parte baja del valle Chancay. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.